

令和元年6月26日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19471

研究課題名（和文）膜タンパク質を標的とした高親和性人工ペプチドリガンドスクリーニングシステムの開発

研究課題名（英文）Development of screening system for high-affinity artificial ligand against membrane proteins

研究代表者

根本 直人（Nemoto, Naoto）

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：60509727

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：バイオ医薬、特に抗体に代表される分子標的医薬は今まで治療が困難だったガン等の疾病に対し有効な方法を提供している。一方、既存の医薬品の50%程度を占めるGタンパク質共役受容体（GPCR）を代表とする膜タンパク質に関しては、抗体そのものが作製できないことから抗体医薬ができない。そこで、本研究では近年、抗体の課題（保存性や高価格など）を克服する中分子医薬と注目されているペプチドアプタマーを用いて、重要な創薬標的でもあるにも関わらず抗体作製が困難なGPCRに対してペプチドアプタマーを取得する新しい方法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により従来から活性が高い抗体の作製が困難なGPCRに対して、ペプチドアプタマーや低分子化抗体といった次世代のバイオ医薬候補分子を迅速に提供することができます。抗体医薬はオプジーボに代表される大変有益な医薬品で全世界では700種類程度の抗体医薬が開発されているといわれています。しかしながら、その対象となる抗原は高々30種類ほどしかなく「抗原枯渇問題」として知られています。本研究により病気の原因となる抗原対象を100種類以上に拡大できます。これにより今まで治療できなかった疾病領域を各段に広げ、人々の健康に大きく貢献すると思われまます。

研究成果の概要（英文）：Over the past 20-year, bio-pharmaceuticals as molecular target drugs, especially antibody drugs have been given some effective ways to treat difficult disorder diseases (i.e., cancer). On the other hand, any antibodies against G protein-coupled receptors (GPCR) which are around 50% of drug targets, have not been developed because high titer of antibodies can not be obtained. Recently, peptide aptamers have been attracting much attention because of its thermal stability and low-cost to overcome antibody's problems. In this study, we have developed a novel method to select some peptide aptamers against GPCR using cDNA display method that is one of powerful evolutionary molecular engineering tools.

研究分野：進化分子工学

キーワード：抗体 アプタマー GPCR 膜タンパク質 進化分子工学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者(根本)は1997年に世界に先駆けて進化工学的手法であるファージディスプレイの試験管内版“in vitro virus”法を開発した(Nemoto et al. FEBS Lett 1997)。これは無細胞翻訳系中で mRNA とそれにコードされたタンパク質を mRNA の 3'末端に連結したピューロマイシンを介して結合させるもので mRNA display 法とも呼ばれている。In vitro virus 法はライブラリーサイズが 10^{13} 程度と膨大であるが mRNA に由来する不安定性により選択条件に大きな制限があった。このため研究代表者らはライブラリーサイズを保ちつつ安定化し、様々な選択条件下でスクリーニングを可能にする cDNA display 法を開発した (Yamaguchi, Nemoto et al. Nucleic Acid Res 2009)。さらに改良を加えてハイスループット化のための One-pot preparation 法 (Mochizuki, Nemoto, et al. ACS Comb Sci. 2011) を開発した。これによりスクリーニング対象を従来不可能であった生細胞や RNA といった不安定な分子にまで拡張することが可能となった (根本、他、生物物理、2013)。また、このような cDNA ディスプレイ技術を応用しわれわれは従来では不可能と考えられた低分子化合物に結合するペプチドアプタマーの試験管内淘汰実験に成功した (Mochizuki, Nemoto, et al., ChemComm, 2014)。このように cDNA display 法の完成度が高まり様々な機能ペプチドの取得が可能になってきている。一方、分担者(戸澤)は試験管内翻訳系を利用する「無細胞タンパク質合成技術」の技術開発に長い経験を有する。無細胞タンパク質合成は年々技術的改良が加えられ、近年では人工二重脂質膜(リポソーム)に膜タンパク質を発現する技術が開発されてきている (Kalmbach, et al., J. Mol. Biol. 2007; Nozawa, Tozawa, et al., Methods Mol. Biol, 2010)。さらに、これを利用した膜タンパク質の機能解析もできるようになってきている (Nozawa, Tozawa, et al., Methods Mol. Biol, 2014)。

本研究では cDNA display 法によるペプチドリガンドスクリーニング技術と標的となる無細胞タンパク質合成による膜タンパク質合成技術を融合させ、従来から主要な創薬標的にも関わらず抗体が作製しにくい G タンパク質共役受容体 (GPCR) 等の膜タンパク質に特異的に結合する人工ペプチドリガンドの創製を目指す。これにより、未知の GPCR の機能解析という挑戦的な課題への道筋をつける。

2. 研究の目的

細胞表面に存在する膜タンパク質には、細胞外部からの信号物質を認識して細胞内へその情報をシグナルとして伝達する膜受容体や、刺激を感知して細胞内にイオンを排出または取込むイオンチャネルなど、生命活動の基本を支える重要な役割をもつものが数多く含まれている。細胞表面に局在する性質より、薬剤標的として応用研究の対象となっているものが多く、応用研究の現場では、実際に多くの膜受容体やイオンチャネルに対し特異的に作用する薬剤の開発が進められている。

膜タンパク質を標的とする抗体を医薬として利用する概念は前世紀に提唱され、現在も多くの応用研究者がこの技術の利用に取組んでいる。第一世代ではファージディスプレイ法を中心とした対象抗原に対する特異的抗体のスクリーニング技術が、近年では例えばラクダが有する特徴的な抗体を利用する系などが注目を集めている。一方、より単純なペプチドそのものをリガンドとしてスクリーニングする系も知られている。いずれの系であっても、肝心なのは正しい構造を有する標的分子を提示すること、そして、アゴニストあるいはアンタゴニストとしてリガンド候補を探索するために適切な数量の母集団を準備すること、さらには有望なリガンド候補を取りこぼし無く同定すること、この3点に集約される。

本研究では、cDNA display 法および機能型膜タンパク質の完全インビトロ再構成系の二つの独自技術を融合し、従来の系を凌駕する効率的な膜タンパク質に対する作用ペプチド(アゴニストあるいはアンタゴニスト)の探索システムの基盤技術の構築を進め、代表的な膜受容体に特異的かつ高親和性の機能性ペプチドリガンド(ペプチドアプタマー)の取得を目的として研究を遂行する。

3. 研究の方法

cDNA display 法 (Ueno, Nemoto, Methods in Mol. Biol., 2012) を技術基盤とし、これを発展的に応用し、ペプチドライブラリーを作製する。各項目に記載する膜タンパク質を標的として、このライブラリーをスクリーニングし、高親和性を有する結合ペプチドを取得する。取得したペプチドの核酸配列をさらに進化工学的手法により変異導入による試験管内分子進化を促し、さらに高親和性のペプチドを開発する。

ライブラリースクリーニングの標的分子となる膜タンパク質の調製技術は、試験管内膜タンパク質合成・再構成法 (Nozawa, Tozawa, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2011) を基盤とし、高品質の膜タンパク質サンプルの調製法を構築する。

確立した技術を応用して、薬剤の標的として極めて重要な位置づけをされているヒトの GPCR に対するアゴニストあるいはアンタゴニストの探索に本技術を応用する。対象タンパク質として既に試験管内タンパク質合成系で機能型として合成することが確認できているヒトのベータ2アドレナリンレセプター($\beta 2$ ADR)を、脂質ベシクル上に合成・提示し、蛍光標識したリポソームに組み込みこれを標的分子とする。この標的分子に cDNA display 法で作出したペプチドライブラリーを作用させ、親和性を示すペプチド候補を蛍光活性化セルソーティング装置(FACS)により選抜する。得られたペプチドについては順次平板膜法によるシング

ルイオンチャンネル電流活性の測定を行い、 β 2ADR の影響を評価する。選択された GPCR 結合ペプチドの結合能を *in vitro* で解析する手法を確立する。少量のサンプル (4 μ l) で平衡定数を測定できる BLI(Bio-Layer Interferometry)法を利用した測定装置を用いてペプチドをバイオセンサー上に固定化し、ベシクル上で発現された GPCR との親和性を測定する。

4. 研究成果

既存の医薬品の薬剤標的の 50% 程度を占める GPCR を代表とする膜タンパク質に関しては、活性の高い抗体そのものが作製できないことから抗体医薬ができないことが問題となっている。本研究は従来の抗体のように動物に免疫することなく、試験管内で抗体に代わる高親和性のペプチドアプタマーを取得することを目的とした。研究分担者の戸澤らは標的タンパク質である膜タンパク質を当初考えていたリポソームではなくナノディスクに埋め込むことにより、膜タンパク質を機能的に保持できることを実証した。また、ナノディスクに埋め込んだ膜タンパク質は機能解析が容易であることも判明した。そのため、研究代表者がこのナノディスクに埋め込まれた膜タンパク質に対して試験管内淘汰を cDNA ディスプレイ法という進化工学的に手法により効率的に行うシステムの開発を行った。具体的には、 β 2ADR という GPCR をナノディスクに小麦胚芽無細胞翻訳系を用いて組み込み、リガンドに対して結合することを確認した。これを His-tag を用いて磁性体ビーズに固定化した。また、9 残基から 13 残基のランダムな配列をもつ環状ペプチドを cDNA display ライブラリとして作製した。すでに調整した β 2ADR を埋め込んだナノディスクに対して cDNA display 法による試験管内淘汰を行った結果、数 100~10 nM 程度の解離定数をもつ環状ペプチドを複数取得することに成功した。cDNA ディスプレイ法は現在注目されている低分子化抗体 (ナノボディ) も取得できることから、この方法により動物免疫をせずに GPCR に対する低分子化抗体を効率よくスクリーニングすることも可能となる。全世界では 700 種類程度の抗体医薬が開発されているが、その対象となる抗原は高々 30 種類ほどしかなく「抗原枯渇問題」として知られている。本研究により疾病の原因となる抗原対象を 100 種類以上に拡大でき、今まで治療できなかった疾病領域を各段に拡張、人々の健康に大きく貢献することが可能となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- 1) Nemoto, N., Kumachi S, Arai H., In Vitro Selection of Single-Domain Antibody (VHH) Using cDNA Display, *Methods in Molecular Biology*, **1827**, 269-285, 2018 (査読有)
- 2) Terai, T., Anzai, H., Nemoto, N., Selection of Peptides that Associate with Dye-Conjugated Solid Surfaces in a pH-Dependent Manner Using cDNA Display, *ACS Omega*, **4**, 7378-7384, 2019 (査読有)
- 3) Anzai H, Terai T, Jayathilake C, Suzuki T, Nemoto, N., A novel immuno-PCR method using cDNA display, *Anal Biochem*, **578**, 1-6, 2019 (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) 寺井 琢也・安齋 宏紀・小林 省太・吉川 祐紀・蛭原 三華・根本 直人, cDNA display 法を用いた機能性ペプチドスクリーニングの最前線, 化学工学会第 49 回秋季大会, 2017 (9/20-22), 名古屋大学
- 2) Hiroki Miyajima, Naoto Nemoto, High-throughput selection of pore-forming peptides assembling in liposome membranes by combining complementary DNA display method with cell sorter system 日本ペプチド学会, 第 54 回[°] 討論会, O-18, 2017(11/22), 大阪府立大学 中百舌鳥キャンパス
- 3) 吉延武留、宮嶋俊樹、關谷悠介、川野竜司、根本直人, フローサイトメトリーを利用したポリア形成ペプチドの進化分子工学, 「細胞を創る」研究会, 「細胞を創る」研究会 11.0, P-21, 2018(10/19), 東北大学サイエンスキャンパスホール

〔図書〕(計 3 件)

- 1) 寺井琢也、熊地重文、根本直人, cDNA ディスプレイ法によるペプチドスクリーニング技術, 「ペプチド医薬品のスクリーニング・安定化・製剤化技術」第 1 章、第 6 節, 40-49, 2017, 技術情報協会 (査読無)
- 2) Miyajima, H., Nemoto, N., High-throughput Selection of Pore-forming Peptides Assembling in Liposome Membranes by Combining cDNA Display Method with Cell Sorter System, *Peptide Science 2017* (Edited by Ikuro Fujii), 30-31, 2018 (査読有)
- 3) Anzai, H., Terai, T., Nemoto, N., A Study to Select pH-dependent Phenolphthalein-binding Peptide Aptamers by cDNA Display Method, *Peptide Science 2017* (Edited by Ikuro Fujii), 54-55, 2018 (査読有)

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：リポソーム結合ペプチド、リポソーム結合ペプチドの作製用のコンストラクト及びリポソーム

発明者：根本直人、宇津木康人

権利者：埼玉大学

種類：日本語

番号：特願 2018-210873

出願年：2018

国内外の別：国内

○取得状況（計1件）

名称：リポソーム結合ペプチド及びその作製方法

発明者：根本直人、小林省太、吉川裕紀

権利者：埼玉大学

種類：日本語

番号：特許第 615804 号

取得年：2018

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.saitama-u.ac.jp/~nemoto/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名： 戸澤 譲

ローマ字氏名： TOZAWA YUZURU

所属研究機関名：埼玉大学

部局名：理工学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：90363267

(2)研究協力者

研究協力者氏名：中井淳一

ローマ字氏名： NAKAI JYUNICHI

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。